

Dung dịch mẫu trắng: Tiến hành như chuẩn bị dung dịch thử (1) nhưng không có chế phẩm.

Đun chảy môi trường dinh dưỡng có công thức dưới đây và cấy vào môi trường chủng vi khuẩn *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) ở nhiệt độ thích hợp để thu được nồng độ 5×10^4 vi khuẩn trong 1 ml môi trường, nồng độ chủng vi khuẩn có thể thay đổi miễn là thu được độ nhạy mong muốn và vòng vô khuẩn rõ ràng, sắc nét, có đường kính phù hợp. Đổ môi trường đã cấy chủng vào 5 đĩa petri đường kính 10 cm để tạo thành lớp môi trường có độ dày từ 2 mm đến 5 mm. Có thể đổ môi trường 2 lớp, trong đó chỉ có lớp môi trường phía trên được cấy chủng. Bảo quản các đĩa petri sao cho vi khuẩn không phát triển thêm hoặc bị chết đi và bề mặt của môi trường khô trước khi sử dụng. Với mỗi đĩa petri, đặt 5 ống trụ bằng thép không gỉ có đường kính trong 6 mm lên bề mặt môi trường theo đường tròn đồng tâm với đĩa petri và có bán kính 25 mm. Với mỗi đĩa petri, nhỏ vào mỗi ống trụ 0,15 ml dung dịch thử (1) và (2), dung dịch đối chiếu (1) và (2) và mẫu trắng. Ủ ở 30 °C trong ít nhất 24 h. Đo đường kính vòng vô khuẩn tạo thành bằng thiết bị đo có độ chính xác ít nhất 0,1 mm.

Phép thử chỉ có giá trị nếu dung dịch đối chiếu (1) có vòng vô khuẩn rõ ràng, dung dịch đối chiếu (2) và mẫu trắng không có vòng vô khuẩn. Nếu dung dịch thử (1) có vòng vô khuẩn và dung dịch thử (2) không có vòng vô khuẩn, có nghĩa vòng vô khuẩn này do penicilin trong dung dịch thử (1) tạo ra. Trong trường hợp này, đường kính vòng vô khuẩn trung bình của dung dịch thử (1) của 5 đĩa petri phải nhỏ hơn đường kính vòng vô khuẩn trung bình của dung dịch đối chiếu (1) trong cùng điều kiện.

Môi trường dinh dưỡng (pH 6,0)

Pepton	5,0 g
Cao nấm men	1,5 g
Cao thịt	1,5 g
Natri clorid	3,5 g
Thạch	15,0 g
Nước cất	1000 ml

Ghi chú:

Tạp chất B: penicilin.

Thủy ngân

Không được quá 10 phần triệu.

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (Phụ lục 4.4, phương pháp 1).

Dung dịch thử: Thêm vào 1,00 g chế phẩm 10 ml nước và 0,15 ml acid percloric (TT) và lắc tròn đến khi hòa tan hoàn toàn. Thêm 1,0 ml dung dịch amoni pyrolidindithiocarbamat 1 % (TT) đã được rửa 3 lần, mỗi lần bằng cùng thể tích methyl isobutyl keton (TT), rửa ngay trước khi dùng. Trộn đều và thêm 2 ml methyl isobutyl keton (TT) và lắc trong 1 min. Pha loãng thành 25,0 ml bằng nước và để yên cho tách lớp, gạn lấy lớp methyl isobutyl keton.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan một lượng thủy ngân oxyd vàng (TT) tương đương với 0,108 g HgO trong một thể tích nhỏ nhất dung dịch acid hydrocloric loãng (TT) và pha loãng thành 1000,0 ml bằng nước (dung dịch thu được có nồng độ 100 phần triệu Hg). Chuẩn bị dung dịch đối chiếu tương tự như dung dịch thử nhưng thay chế phẩm bằng một thể tích thích hợp dung dịch chứa 100 phần triệu Hg.

Đo độ hấp thụ ở bước sóng 254 nm, dùng đèn cathod rỗng thủy ngân làm nguồn bức xạ và ngọn lửa không khí - acetylen.

Điều chỉnh thiết bị về 0 bằng lớp methyl isobutyl keton thu được bằng cách chuẩn bị một mẫu trắng như với dung dịch thử nhưng không có chế phẩm.

Kim loại nặng

Không được quá 20 phần triệu (Phụ lục 9.4.8).

Lấy 12 ml dung dịch S tiến hành theo phương pháp 1. Dùng dung dịch chì mẫu 2 phần triệu Pb (TT) để chuẩn bị mẫu đối chiếu.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 0,5 % (Phụ lục 9.6).

(1,000 g; 60 °C trong chân không áp suất không quá 0,67 kPa, phosphor pentoxyd).

Tro sulfat

Không được quá 0,1 % (Phụ lục 9.9, phương pháp 2).

Dùng 1,0 g chế phẩm.

Định lượng

Hòa tan 0,1000 g chế phẩm trong 30 ml acid acetic khan (TT). Chuẩn độ bằng dung dịch acid percloric 0,1 N (CĐ), xác định điểm kết thúc bằng phương pháp chuẩn độ điện thế (Phụ lục 10.2).

1 ml dung dịch acid percloric 0,1 N (CĐ) tương đương với 14,92 mg C₅H₁₁NO₂S.

Bảo quản

Trong bao bì kín, tránh ánh sáng.

Loại thuốc

Tác nhân tạo phức, giải độc kim loại.

Chế phẩm

Viên nén.

PEPSIN

Pepsin là chế phẩm dạng bột chứa men tiêu protein, lấy từ niêm mạc còn tươi của dạ dày lợn, trâu, bò hoặc cừu, tác dụng trong môi trường acid (pH từ 1 đến 5), phải có hoạt lực không ít hơn 0,5 đơn vị trong 1 mg, tính theo chế phẩm đã làm khô.

Động vật lấy bột pepsin phải đáp ứng các yêu cầu về sức khỏe động vật phù hợp sử dụng cho người và yêu cầu của cơ quan có thẩm quyền.

Phải chỉ ra phương pháp đã dùng để loại bỏ sự nhiễm virus hay các tác nhân gây nhiễm khác.

Tính chất

Bột kết tinh hoặc vô định hình màu trắng hay vàng nhạt, hút ẩm. Tan trong nước, thực tế không tan trong ethanol 96 %. Dung dịch trong nước có thể hơi đục lơ và có phản ứng acid nhẹ.

Định tính

Trong cối sứ cho 30 mg *fibrin xanh* (TT), tạo hỗn dịch với 20 ml *dung dịch acid hydrochloric loãng* (TT). Lọc hỗn dịch và rửa giấy lọc với *dung dịch acid hydrochloric loãng* (TT) cho đến khi dịch lọc không màu. Chọc thủng giấy lọc và rửa fibrin xanh qua lỗ thủng vào một bình nón bằng 20 ml *dung dịch acid hydrochloric loãng* (TT). Lắc hỗn hợp này trước khi dùng. Hòa tan một lượng chế phẩm không ít hơn 20 đơn vị hoạt lực trong 2 ml *dung dịch acid hydrochloric loãng* (TT) và điều chỉnh đến pH $1,6 \pm 0,1$ (dung dịch thử). Cho vào hai ống nghiệm, mỗi ống 4 ml hỗn dịch fibrin được điều chế ở trên. Thêm vào một ống 1 ml dung dịch thử và ống còn lại 1 ml *nước* (mẫu trắng). Trộn đều các ống và cho vào nồi cách thủy ở 25°C , lắc nhẹ trong 15 min. Dung dịch mẫu trắng không có màu và dung dịch thử phải có màu xanh.

Mất khối lượng do làm khô

Không được quá 5,0 % (Phụ lục 9.6).

(0,500 g; phosphor pentoxyd; áp suất không quá 0,7 kPa; 60°C ; 4 h).

Giới hạn nhiễm vi sinh vật

Tổng số vi sinh vật hiếu khí: Không quá 10^4 CFU/g.

Tổng số nấm: Không quá 10^2 CFU/g.

1,0 g chế phẩm không được có *Escherichia coli* và 10 g chế phẩm không được có *Salmonella* (Phụ lục 13.6).

Định lượng

Hoạt lực của pepsin được xác định bằng cách so sánh lượng peptid không bị tiêu bởi *dung dịch acid trichloroacetic* (TT) và được định lượng bằng cách sử dụng *thuốc thử phosphomolibdotungstic* (TT), giải phóng từng phút từ cơ chất là dung dịch hemoglobin, với lượng peptid giải phóng từ pepsin đối chiếu với cùng cơ chất và cùng điều kiện. Tránh lắc và làm sủi bọt các dung dịch thử và dung dịch chuẩn trong quá trình định lượng.

Dung dịch thử: Chuẩn bị ngay trước khi dùng một dung dịch chế phẩm chứa 0,5 đơn vị/ml trong *dung dịch acid hydrochloric loãng* (TT). Trước khi pha loãng đến thể tích cần thiết điều chỉnh đến pH $1,6 \pm 0,1$ nếu cần bằng *dung dịch acid hydrochloric 1 M* (TT).

Dung dịch chuẩn: Chuẩn bị dung dịch pepsin chuẩn chứa 0,5 đơn vị/ml trong *dung dịch acid hydrochloric loãng* (TT). Trước khi pha loãng điều chỉnh đến pH $1,6 \pm 0,1$ nếu cần bằng *dung dịch acid hydrochloric 1 M* (TT).

Chi pha trong vòng 15 min trước khi dùng. Chuẩn bị các cặp ống nghiệm T, T_b , S_1 , S_{1b} , S_2 , S_{2b} , S_3 , S_{3b} và ống B. Thêm *dung dịch acid hydrochloric loãng* (TT) vào các ống nghiệm như sau:

B: 1,0 ml

S_1 và S_{1b} : 0,5 ml

S_2 , S_{2b} , T, và T_b : 0,25 ml

Thêm dung dịch đối chiếu vào các ống nghiệm như sau:

S_1 và S_{1b} : 0,5 ml

S_2 và S_{2b} : 0,75 ml

S_3 và S_{3b} : 1,0 ml

Thêm 0,75 ml dung dịch thử vào ống nghiệm T và T_b .

Thêm 10,0 ml *dung dịch acid trichloroacetic* (TT) vào các ống S_{1b} , S_{2b} , S_{3b} , T_b và B. Trộn đều.

Đặt các ống nghiệm và *dung dịch hemoglobin* (TT) trong cách thủy ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Khi nhiệt độ đã cân bằng, thêm 5,0 ml *dung dịch hemoglobin* (TT) vào ống nghiệm B, S_{1b} , S_{2b} , S_{3b} và T_b . Trộn đều. Thêm 5,0 ml *dung dịch hemoglobin* (TT) lần lượt và cách nhau 30 s vào ống nghiệm S_1 , S_2 , S_3 và T. Trộn đều ngay sau mỗi lần thêm.

Đúng 10 min sau khi thêm *dung dịch hemoglobin* (TT) dùng phản ứng bằng cách thêm 10,0 ml *dung dịch acid trichloroacetic* (TT) vào ống S_1 , S_2 , S_3 và T mỗi lần cách nhau 30 s. Trộn đều.

Lọc các ống nghiệm (thử và trắng) qua giấy lọc thích hợp đã được rửa trước bằng *dung dịch acid trichloroacetic 5 %* (TT) sau đó là *nước* và làm khô. Bỏ 5 ml dịch lọc đầu. Lấy 3,0 ml mỗi dịch lọc riêng biệt vào ống nghiệm chứa 20 ml *nước*. Trộn đều.

(Giấy lọc thích hợp là giấy lọc đáp ứng các phép thử sau: Lọc 5 ml *dung dịch acid trichloroacetic 5 %* (TT) qua một giấy lọc trắng, tròn, đường kính 7 cm. Độ hấp thụ của dịch lọc ở 275 nm (Phụ lục 4.1), dùng *dung dịch acid trichloroacetic 5 %* (TT) không lọc làm mẫu trắng, phải ít hơn 0,04).

Toàn bộ quá trình trên được ghi ở Bảng A.

Thêm vào mỗi ống nghiệm 1,0 ml *dung dịch natri hydroxyd 20 %* (TT) và 1,0 ml *thuốc thử phosphomolibdotungstic* (TT) bắt đầu từ các ống trắng sau là các ống thử theo thứ tự như trên.

Sau 15 min đo độ hấp thụ (Phụ lục 4.1) của dung dịch S_1 , S_2 , S_3 , S_{1b} , S_{2b} , S_{3b} , T và T_b ở bước sóng 540 nm dùng dịch lọc của ống B làm mẫu trắng.

Hiệu chỉnh độ hấp thụ của dịch lọc từ ống S_1 , S_2 , S_3 bằng cách lấy độ hấp thụ đo được trừ đi độ hấp thụ dịch lọc S_{1b} , S_{2b} , S_{3b} theo thứ tự.

Vẽ đường cong chuẩn giữa độ hấp thụ đã tính và hoạt lực dung dịch đối chiếu đã dùng.

Xác định hoạt lực của chế phẩm dùng độ hấp thụ của dung dịch thử (T - T_b) từ đường cong chuẩn và tính toán độ pha loãng.

Bảo quản

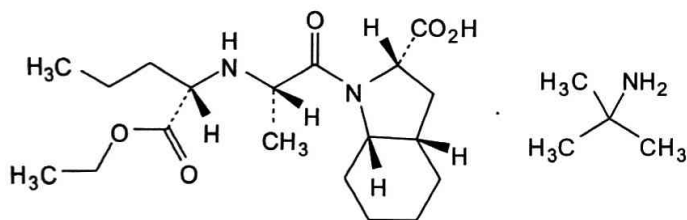
Trong đồ đựng kín, tránh ánh sáng và ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C .

Bảng A

	Ổng nghiệm								
	S ₁	S _{1b}	S ₂	S _{2b}	S ₃	S _{3b}	T	T _b	B
Dung dịch acid hydrochloric loãng (TT) (ml)	0,5	0,5	0,25	0,25			0,25	0,25	1,0
Dung dịch đối chiếu (ml)	0,5	0,5	0,75	0,75	1,0	1,0			
Dung dịch thử (ml)							0,75	0,75	
Dung dịch acid trichloroacetic (TT) (ml)		10,0		10,0		10,0		10,0	10,0
Trộn		+		+		+		+	+
Trong cách thủy ở 25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dung dịch hemoglobin (TT) (ml)		5,0		5,0		5,0		5,0	5,0
Trộn		+		+		+		+	+
Dung dịch hemoglobin (TT) (ml)	5,0		5,0		5,0		5,0		
Trộn	+		+		+		+		
Trong cách thủy ở 25 °C 10 min	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dung dịch acid trichloroacetic (TT) (ml)	10,0		10,0		10,0		10,0		
Trộn	+		+		+		+		
Lọc	+	+	+	+	+	+	+	+	+

PERINDOPRIL *tert*-BUTYLAMIN

Perindopril erbumin



C₁₉H₃₂N₂O₅.C₄H₁₁N

P.t.l: 441,6

Perindopril *tert*-butylamin là 2-methylpropan-2-amin (2*S*,3*aS*,7*aS*)-1-[(2*S*)-2-[[[(1*S*)-1-(ethoxycarbonyl)butyl]amino]propanoyl]octahydro-1*H*-indol-2-carboxylat, phải chứa từ 99,0 % đến 101,0 % C₁₉H₃₂N₂O₅.C₄H₁₁N, tính theo chế phẩm khan.

Tính chất

Bột kết tinh đa hình màu trắng hay gần như trắng, hút ẩm nhẹ.

Đễ tan trong nước và ethanol 96 %, tan hoặc hơi tan trong dicloromethan.

Định tính

A. Phổ hấp thụ hồng ngoại (Phụ lục 4.2) của chế phẩm phải phù hợp với phổ hấp thụ hồng ngoại của perindopril *tert*-butylamin chuẩn. Nếu so sánh phổ có sự khác nhau thì hòa tan mẫu thử và mẫu đối chiếu riêng biệt trong dicloromethan (TT), bay hơi đến khô và dùng cân để đo phổ mới.

B. Trên sắc ký đồ thu được từ phép thử Tạp chất A, dung dịch thử cho một vết có R_f tương ứng với vết có R_f lớn hơn trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3) (*tert*-butylamin).

C. Góc quay cực riêng: Từ -66° đến -69°, tính theo chế phẩm khan (Phụ lục 6.4).

Hòa tan 0,250 g chế phẩm trong ethanol 96 % (TT) và pha loãng thành 25,0 ml với cùng dung môi.

Tạp chất A

Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel G.

Dung môi khai triển: Acid acetic băng - toluen - methanol (1 : 40 : 60).

Dung dịch thử: Hòa tan 0,20 g chế phẩm trong methanol (TT) và pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu (1): Hòa tan 5 mg tạp chất A chuẩn của perindopril trong methanol (TT) và pha loãng thành 25,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch đối chiếu (2): Pha loãng 5,0 ml dung dịch đối chiếu (1) thành 20,0 ml với methanol (TT).

Dung dịch đối chiếu (3): Thêm 5 ml dung dịch đối chiếu (1) vào 5 ml dung dịch 1,1 dimethylethylamin 2 % trong methanol (TT).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 10 µl mỗi dung dịch thử, dung dịch đối chiếu (2) và dung dịch đối chiếu (3). Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 2/3 bản mỏng. Lấy bản mỏng ra, để khô trong luồng không khí ẩm sau đó đặt vào bình bão hòa hơi iod trong ít nhất 20 h. Trên sắc ký đồ của dung dịch thử, bất kỳ vết nào tương ứng với vết tạp chất A thì không được đậm hơn vết tương ứng trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch đối chiếu (2) (0,25 %). Phép thử chỉ có giá trị khi trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3) cho 2 vết tách riêng biệt.

Ghi chú:

Tạp chất A: Acid (2*S*,3*aS*,7*aS*)-octahydro-1*H*-indol-2-carboxylic.